

Методы синтеза и технология производства лекарственных средств

© Коллектив авторов, 2002

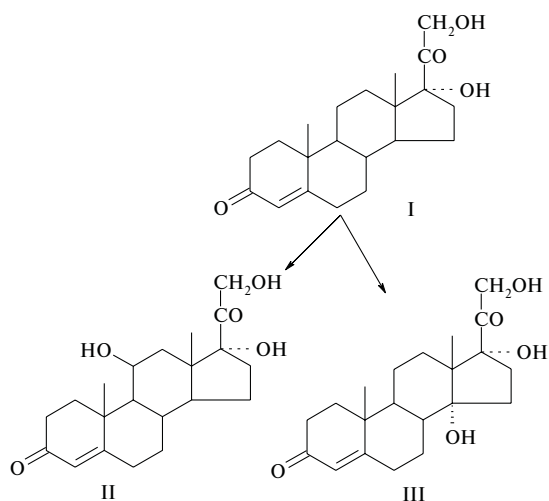
С. Д. Шувалова, К. Н. Габинская

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ КОРТЕКСОЛОНА В ГИДРОКОРТИЗОН

Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

Микробиологическое 11β -гидроксилирование стероидной молекулы является одной из важнейших реакций в синтезе лекарственных препаратов [1, 2]. 11β -гидроксилирование кортексолона (I) с помощью *Curvularia lunata* приводит к образованию гидрокортизона (II), который, являясь лекарственным препаратом, также служит сырьем для синтеза более активных лекарственных средств, таких как преднизолон, кортинеф и др.

Процесс проводят при концентрации субстрата до 10 г/л [3, 4]. 11β -гидроксилирующая активность гриба зависит от его физиологического состояния и доступности субстрата для гидроксилаз гриба.



Известно (схема), что процесс проходит неселективно: наряду со II образуется побочный продукт — 14α -гидрокси-производное кортексолона (III). Кроме того, в реакционной среде может оставаться непрореагировавшее исходное соединение (I), поэтому способ выделения продукта реакции имеет большое значение. В данной работе описаны результаты, полученные при подборе оптимального режима проведения процесса 11β -гидроксилирования и выборе эффективного способа выделения целевого продукта.

Состав среды, условия для поддержания культуры *Curvularia lunata* и выращивания посевного материала описаны ранее [5]. Выращивание первого инокулята осуществлялось на среде "Н", для выращивания второго инокулята использовали среды "Н" и "А". В состав этих сред входят ферментализат биомассы микроорганизмов и соли. В качестве источника углерода в

среде "Н" используют сахарозу, а в среде "А" — глюкозу. Кроме того, в состав среды "А" входит богатый природный компонент — соевая мука, в присутствии которого происходит изменение физиологии и морфологии гриба. На среде "Н" происходит физиологическое подкисление среды до $\text{pH} = 3$, что ограничивает рост биомассы до 1,2 г/100 мл среды. Морфология гриба варьирует от смеси шариковидного и ватообразного на среде "Н" до полностью ватообразного, более темного цвета на среде "А". Это связано с образованием меланина, синтез которого тормозится в кислой и усиливается в нейтральной среде [6]. Такой мицелий из-за своей вязкости уменьшает массообмен, доступность субстрата и кислорода для ферментов гриба [7], гриб плохо фильтруется при проведении трансформации отмытым мицелием. Гидроксилирующая активность мицелия, выращенного на среде "Н" и "А" примерно одинакова, т.е. изменения в морфологии гриба и его количестве слабо влияют на его ферментативную активность (табл. 1, 2). Это совпадает с данными [8], полученными для гриба *Tieghemella hyalospora*, где добавление богатого природного комплекса — кукурузного экстракта — превращает мицелий из шариковидного в ватообразный и слабо изменяет его 11α -гидроксилирующую активность. В дальнейшей работе чаще используют среду "Н".

Гидроксилирующая активность гриба тесно связана с его физиологическим состоянием — возраст первого и второго инокулятов варьировали от 24 до 72 ч. Данные представлены в табл. 1, из которой следует, что значение имеет только возраст 2-го инокулята: 48 ч мицелий обладает низкой активностью, а 24 ч и 72 ч посевной более высокой активностью. В дальнейшей работе второй инокулят выращивают 24 или 72 ч.

В стадии трансформации вносили физиологически молодой мицелий из логарифмической фазы роста [6]. Из данных табл. 1 следует, что оптимальное время трансформации составляет 48 ч. Изменение количества мицелия не влияет на активность культуры.

В качестве среды для проведения трансформации отмытым мицелием использовали 0,5 % раствор глюкозы, фосфатный буфер $\text{pH} 6,2$ или физиологический раствор. Как следует из табл. 2, использование 0,5 % раствора глюкозы и фосфатного буфера было предпочтительнее.

В дальнейшей работе использовался 0,5 % раствор глюкозы. В такой среде не происходит автолиза мицелия и возможен его вторичный рост. Процесс 11 β -гидроксилирования характеризуется низкой эффективностью, обусловленной, прежде всего, малой растворимостью субстрата (0,06 г/л) [3]. Внесение I в органическом растворителе ограничено токсическим действием последнего, поэтому его использование ограничено нагрузкой 4 г/л. При более высокой нагрузке используют внесение I в тонко измельченном состоянии без растворителя. Изучены следующие варианты внесения I в среду для трансформации:

в виде раствора в метаноле, содержащем 10 % CaCl₂,

сухой микронизированный,

влажная паста, полученная переосаждением из диметилформамида,

5 % или 10 % водная суспензия, полученная в шаровой мельнице с фарфоровыми шарами.

Данные по результатам трансформации при внесении I вышеприведенными способами представлены в табл. 3. Самый высокий выход II получен при внесении I в виде раствора в метаноле, содержащем 10 % CaCl₂. Несколько меньший выход получился при использовании микронизированного стероида. В обоих вариантах через 48 ч остается незначительное количество исходного и образуется мало побочного продукта III. При использовании переосажденного субстрата трансформация проходит практически за 24 ч, при этом I отсутствует, но выход целевого продукта II ниже. Использование шаровой мельницы нецелесообразно. Можно предположить, что влияние способа внесения I на гидроксилирующую активность гриба связано с размером частиц: в переосажденном I размер частиц от 2 до 6 нм, в сухом измельченном — 3 – 20 нм, измельченном на мельнице до 40 нм.

Известно, что стероиды легко адсорбируются мицелием и извлекаются с большим трудом, поэтому при экстракции культуральной жидкости вместе с мицели-

ем не удается полностью извлечь продукты трансформации. Легче их извлекать отдельно из жидкой фазы и мицелия. В наших исследованиях по данным ВЭЖХ в жидкой фазе содержалось 52 % II, следы исходного и III. На мицелии находилось 12 % II, 12 % исходного и 8 % III. Для более полного извлечения продукта, сорбированного на мицелии, использовали его механическое измельчение [9]. Благодаря этому удалось повысить выход II на 10 %.

Для выделения II использовали различные растворители: хлороформ, хлористый метилен, этилацетат и адсорбент “поролас”-Т, используемый для специфической адсорбции стероидов [10]. Последний вносили в культуральную жидкость в 10 кратном количестве по отношению к I. Десорбцию продукта II осуществляли этилацетатом. Этот метод позволяет получить II с выходом 40 %. Установлено, что из вышеуказанных растворителей наиболее эффективным для более полного извлечения I является этилацетат.

Таким образом, в результате изучения процесса 11 β -гидроксилирования I отмытым мицелием гриба *Curvularia lunata* найдено, что в подобранных условиях при увеличении концентрации I от 4 г/л до 8 г/л, выход II составил от 1,8 до 3 г/л.

Экспериментальная часть

Хроматографический анализ проводили на пластинках Silufol UV-254 в системе хлороформ – ацетон 7:3, проявление 1 % раствором ванилина в 10 % водном растворе хлорной кислоты.

Количественное определение продуктов трансформации проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Gilson на колонке Silasorb C-18.

Выращивание культуры и проведение трансформации

Культура *Curvularia lunata* и условия ее поддержания и выращивания описаны [5]. Мицелий выращивали в два инокулята 48 и 24 ч соответственно. Транс-

Таблица 1

Влияние возраста посевного материала на выход гидрокортизона (4 г/л)

Среда для выращивания II-го инокулята	Возраст посевного материала, ч		Биомасса г/100 мл	Время трансформации, ч					
	1-го инокулята	2-го инокулята		24		48		72	
				Гидрокортизон (II)%	Исходное (I)%	Гидрокортизон (II)%	Исходное (I)%	Гидрокортизон (II)%	Исходное (I)%
Н	24	48	0,8	15	55	20	40	25	25
	24	72	1,3	24	36	47	25	60	10
	48	24	1,0	31	51	65	32	60	15
	48	48	1,1	20	55	33	40	40	10
	48	72	1,3	35	50	50	12	50	5
	72	24	0,9	50	35	50	—	—	—
	72	48	1,2	17	45	27	20	35	25
А	24	72	1,5	23	52	47	21	60	20
	48	24	1,7	30	47	50	30	52	15
	48	72	2,0	22	48	40	10	47	10
	72	24	1,5	25	55	50	23	55	10

Таблица 2
Влияние среды для проведения трансформации на выход гидрокортизона 4 г/л

Среда для выращивания II-го инокулята	Среда для проведения трансформации	Время трансформации 48 ч		
		Гидрокортизон (II)%	14-α-окси-производное (III)%	Исходное (I)%
Н	Физиологический раствор	50	10	2
	0,5 % раствор глюкозы	70	20	—
	Фосфатный буфер	70	10	10
А	Физиологический раствор	44	7	6
	0,5 % раствор глюкозы	65	6	—
	Фосфатный буфер	68	8	—

формацию проводили в 0,5 % растворе глюкозы, исходное вносили в виде раствора в метаноле, содержащем 10 % CaCl₂. Продолжительность трансформации 48 ч при нагрузке 4 г/л. При нагрузке 6 г/л и 8 г/л I вносили в микронизированной форме.

Для выделения продуктов трансформации с помощью адсорбента поставлены опыты с концентрацией I 4 г/л. Через 48 ч трансформации содержимое 2 колб (0,2 × 2 = 0,4 г) объединяют вместе, вносят 4 мл смолы пороласа Т и перемешивают на качалке в течение 4 ч. Смолу извлекают и проводят десорбцию 30 мл этилацетата на качалке в течение 30 мин. Процедуру повторяют четыре раза. Этилацетатный раствор упаривают и получают 0,25 г кристаллического осадка. Полученный продукт чистят через аддукт с хлороформом, с последующей обработкой ацетоном и эфиром, в результате чего получают II с выходом 40 %, считая на загруженный I, т.пл. 204 – 206 °С. Литературные данные [11] т.пл. 209 °С.

Культуральная жидкость после обработки смолой содержит 10 % неадсорбированного II, что приводит к необходимости дополнительной экстракции культуральной жидкости. Поставлены опыты с концентрацией I 6 и 8 г/л, соответственно по 0,3 и 0,4 г. После 48 ч трансформации содержимое 2 колб (0,3 × 2 = 0,6 г) объединяют вместе, мицелий отделяют от жидкой фазы фильтрацией, механически измельчают в ступке и экстрагируют этилацетатом 3 раза по 30 мл. Жидкую фазу экстрагируют этилацетатом в соотношении 1:1, процедуру экстракции повторяют 3 раза.

Таблица 3
Влияние способа внесения (I) на его превращение в гидрокортизон (II) 4 г/л

Способ внесения I	Время трансформации, ч	Гидрокортизон (II), %	14α-окси-производное (III), %	Исходное (I), %
Раствор в метаноле, содержащем 10 % CaCl ₂	48	60	10	10
Паста, полученная переосаждением	24	35	5	следы
Сухой микронизированный	48	55	7	12
Водная суспензия после шаровой мельницы	48	25	2,5	5

После упаривания объединенных растворов из опыта с концентрацией 6 г/л (загрузка 0,3 г) получают 0,26 г кристаллического остатка. Выход II после очистки составил 43 %, считая на I.

При концентрации 8 г/л содержимое 2 колб (0,2 × 2 = 0,4 г) объединяют и проводят выделение II как описано выше. Получено 0,35 г технического продукта. Выход очищенного II составил 38 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Ахрем, Ю. А. Титов, *Стероиды и микроорганизмы*, Мир, Москва (1970).
2. Г. М. Могильницкий, К. Н. Габинская, *Микробиол. промышленность*, **9**(117), 25 – 32 (1974).
3. Г. В. Суходольская, Б. А. Ангелова, К. А. Кошеенко и др., *Прикл. биохим. и микробиол.*, **27**(5), 701 – 710 (1991).
4. Г. С. Гриненко, В. М. Рыжкова, Н. П. Сорокина и др., А.с. СССР No. 555115, *Бюл. изобрет.*, No. 15 (1977).
5. С. Д. Шувалова, К. Н. Габинская, Е. В. Попова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **35**(3), 44 – 46 (2001).
6. Э. Р. Умнова, Л. И. Воробьева, *Биол. наука*, **3**, 122 – 126 (1992).
7. В. Köhig, K. Dchuger, C. Seedold, et al., *Biotech. Bioeng.*, **24**(2), 259 – 280 (1982).
8. К. Н. Габинская, *Микробиол.*, **XLV**(2), 322 – 325 (1976).
9. A. A. Zohri and M. S. M. Abdel-galil, *Folia Microbiol.*, **44**(3), 277 – 282 (1999).
10. В. А. Андрюшина, Т. С. Стыщенко, Т. Г. Баклашова и др., Патент РФ 2093518 (1997), *Бюл. изобрет.*, № 29 (1997).
11. Г. М. Могильницкий, Л. А. Краснова, Г. К. Скрябин и др., *Приклад. биохим. и микробиол.*, **9**(2), 240 – 245 (1973).

Поступила 04.06.02